R. UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

IMPERIAL MYCOLOGICAL INSTITUTE
13 DEC 1939

137

O. VERONA E F. ROSSI

SULLA UTILIZZAZIONE MICRORGANICA DI ALCUNI IDROCARBURI

Estratto dal *Nuovo Giornale Botanico Italiano*
N. S., vol. XLIV, 1937

Prof. ONORATO VERONA e Dott. FRANCESCO ROSSI

SULLA UTILIZZAZIONE MICRORGANICA DI ALCUNI IDROCARBURI

(CON TAV. I - II E 11 FIG. NEL TESTO)

SOCIETÀ BOTANICA ITALIANA
FIRENZE
1937

★ ★ ★ ★ ★ ★ Pubblicato in
NUOVO GIORNALE BOTANICO ITALIANO,
Nuova Serie, Vol. XLIV, pp. 251-272, 1937 ★
Edito dalla SOCIETÀ BOTANICA ITALIANA
★ Stampato nella TIPOGRAFIA MARIANO RICCI
FIRENZE, ITALIA ★ 30 Giugno 1937

Firenze — Tipografia Mariano Ricci, Via S. Gallo, 31

Prof. ONORATO VERONA e Dott. FRANCESCO ROSSI

SULLA UTILIZZAZIONE MICRORGANICA DI ALCUNI IDROCARBURI

(CON TAV. I - II E 11 FIG. NEL TESTO) (*)

Qualche tempo addietro uno di noi [1] ebbe occasione di rinvenire, immerse nel petrolio, alcune forme microrganiche. Nel segnalare il fatto fu convenuto di ammettere una grande tollerabilità di esse forme di fronte al petrolio e agli idrocarburi alifatici in genere, e supposta — in base a precedenti esperienze — una utilizzazione diretta del carbonio alifatico quale sorgente energetica. Alla dimostrazione di questo fatto, tendono le presenti ricerche.

Le notizie che si hanno in materia non sono molto numerose nè, invero, esaurienti all'infuori di quanto concerne l'ossidazione del metano sufficientemente studiata da SÖHNGEN [2] e KASERER [3], ossidazione che verrebbe effettuata — con meccanismo poco chiaro — da *Bac. methanicus* Söhngen e da altri germi [4].

In quanto ad altri idrocarburi abbiamo una segnalazione di RAHN [5] il quale dimostrò che la paraffina è utilizzata da un *Penicillium*; di GOLA [6] che rinvenne un fungo demaziaceo non determinato sviluppantesi su vasellina; e, ancora, di SÖHNGEN [7] che trovò attivi su molti idrocarburi (benzolo, petrolio, olio di paraffina, paraffina) *Pseudomonas fluorescens, Pseudom. putida, Pseudom. pyocyanea, Pseudom. punctata, Bac. Stutzeri, Micr. paraffinae* ed alcuni *Mycobacterium* molto sommariamente descritti. Altre ricerche si debbono a BÜTTNER [8] che fermò la sua attenzione su di alcuni *Mycobacterium* rinvenuti in paraffina; e TAUSZ e PETER [9] che isolarono e descrissero *Bact. aliphaticum, Bact. aliphaticum liquefaciens* e un *Batterio della paraffina;* ad HAAG [10] che indagò ancora l'utilizzazione batterica della paraffina; ed infine a LIPMANN e GREENBERG [11] che sembra abbiano accertata l'esistenza di forme autotrofiche capaci di decomporre il petrolio.

(*) Fotografie del Sig. R. MATTII.

Tecnica seguita.

Gli sperimentatori che ci hanno preceduto hanno fatto generalmente uso, come mezzi di arricchimento o di isolamento delle forme, di colture a piatto allestite con agar.

Così è che SÖHNGEN ha seminato con terra, letame o liquido cloacale il seguente substrato:

acqua di fonte	1000
fosfato bipotassico	0,5
cloruro ammonico	0,5
carbonato di calcio	tr.
idrocarburo	10

con il quale, dopo un periodo di incubazione più o meno lungo, ha proceduto a colture d'isolamento usando agar di carne o agar di Beijerinck lavato sottoposti all'azione dei vapori di petrolio a mezzo del dispositivo di cui alla fig. 1. TAUSZ e PETER hanno seminato con terra di giardino soluzioni minerali o decotti di foglie addizionati di gocce degli idrocarburi in esperimento e proceduto all'isolamento mediante colture all'agar di carne.

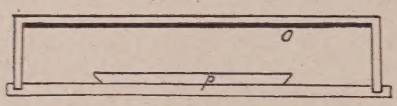


Fig. 1. — Dispositivo per la coltura dei microbi in agar (*o*), a contatto coi vapori del petrolio contenuto nella capsula *p*. (da SÖHNGEN).

Riprendendo l'argomento, a noi è sembrato pregiudiziale di rivedere la tecnica precedentemente usata e di procedere ad alcune fondamentali modificazioni aventi di mira la eliminazione (nei mezzi selezionanti, isolanti e nel materiale d'innesto) di ogni sorta di composto minerale od organico contenente carbonio che non fosse quello in esperimento. Così si è cercato sempre di:

1.°) non fare uso come materiale di semina di terra, letame o colaticcio ricorrendo, invece, all'inquinamento spontaneo;

2.°) eliminare dal mezzo selezionante, esclusivamente minerale, e anidride carbonica e carbonati;

3.°) eliminare nelle colture isolanti l'uso di substrati agarizzati sostituendoli con i geli di silice.

Onde eliminare la presenza della CO_2 atmosferica si è operato o in atmosfera di idrogeno, o facendo uso di semplice dispositivo rappresentato in fig. 2.

Il recipiente di coltura è costituito dal vaso *O* a perfetta tenuta, provvisto di termometro *t* e di due fori con tappo a tenuta e rubinetto *f* ed *f'* situati rispettivamente in alto e in basso della parete laterale. Entro *O*,

su di un supporto metallico, poggia la piastra. Trattandosi di colture liquide (c. selezionanti) il recipiente *O* può essere sostituito con il recipiente *O'*. In un caso e nell'altro, all'inizio dell'esperienza il recipiente di coltura, una volta chiuso, si collega a mezzo di *f* con una batteria costituita da una serie di bottiglie di lavaggio *A, B, C,* atte a trattenere il biossido di carbonio e a mezzo di *f'* con un aspiratore ad acqua. Ciò fatto si fa passare aria per un certo tempo; indi si innesta *f'* con il recipiente *D* contenente acqua di barite onde accertarsi che non vi sia più, in *O* (o in *O'*), an. carbonica. Allora si chiudono *f* ed *f'* e si coltiva.

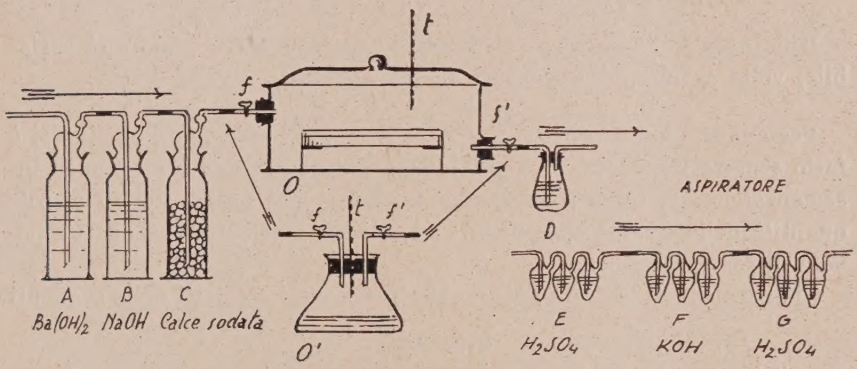


Fig. 2. — Dispositivo per coltura in ambiente privo di CO_2.

A termine dell'esperienza si ricollega di nuovo *f* con *A, B, C* e *f'* con la batteria *E-F-G* costituita da tre bolle di Mohr contenenti *E* e *G*, H_2SO_4 conc.; *F*, KOH. Si aspira: *E* costituisce l'apparato essiccante ove viene trattenuta, eventualmente, l'umidità dell'ambiente; *F*, l'apparato assorbente CO_2; mentre *G* è destinato a ricuperare il vapore acqueo asportato dalla soluzione di KOH. Essendo noto, prima dell'aspirazione, il peso di *F* e di *G*, è facile determinare la quantità di CO_2 formatesi ripesando, a termine dell'aspirazione, *F* e *G*.

Per quanto si riferisce ai mezzi colturali abbiamo fatto uso dei seguenti due substrati:

1.°) *m. liquido*:

acqua distillata	1000
nitrato di potassio	2
fosfato bipotassico	0,5
solfato di magnesio	0,5
solfato di manganese	tr.
cloruro ferrico	tr.
idrocarburo	(quantità variabile a seconda delle esperienze)

2.°) *m. solido*:

gelatina di silice contenuta in scatole di cm. 14 di diametro; dopo solidificazione del gelo e successiva eliminazione dell'HCl, in ogni piastra vennero aggiunti cc. 7 della seguente soluzione:

acqua distillata	100
nitrato potassico	5
fosfato bipotassico	2
solfato di magnesio	1
solfato di manganese	tr.
cloruro di ferro	tr.

gocce di KOH 2% fino a pH 7,2 circa.

Eliminata per evaporazione l'acqua, venne aggiunto in quantità variabile, volta a volta, l'idrocarburo in esperimento.

Per quanto, infine, si riferisce al materiale d'innesto o di semina si è fatto sempre uso, come si è premesso, dell'inquinamento spontaneo insemenzando con terra solo raramente, e ad ogni modo usando piccole quantità dello stemperamento in acqua di terra priva di carbonati e povera di sostanze umiche.

Ciò premesso e fissato togliamo dal protocollo i risultati delle seguenti

Esperienze.

Demolizione del Petrolio e dell'Olio di paraffina da parte di colture spontanee.

1.ª Serie di esperienze.

Esp. n. 1. — Erlenmeyer da cc. 1000 contenenti cc. 250 del liquido 1 addizionato di cc. 0,5 di petrolio comune (densità = 0,7863).

Recipiente e liquido non sterilizzati.

Durata dell'esperienza giorni 12 a 24° C. in atmosfera priva di CO_2.

Al termine del 12° giorno sviluppo nel liquido evidente a mezzo d'intorbidamento, sottile velo, deposito.

CO_2 formatasi = mgr. 80,6.

Esp. n. 2. — Come l'esp. precedente ma con aggiunta, al liquido, di cc. 0,5 di olio di paraffina invece di petrolio.

Sviluppo microbico meno evidente.

CO_2 formatasi = mgr. 23,4.

Esp. n. 3. — Piastra al silico-gele di cm. 14 di diametro.

Soluz. di sali (liq. 2) cc. 7, più *petrolio* cc. 1.

Atmosfera priva di CO_2.

Durata dell'esp. *giorni* 7 a 24° C.

Sviluppo microbico evidentissimo.

CO_2 formatasi = mgr. 41,7.

Esp. n. 4. — Piastra al silico-gele di cm. 14 di diametro.

Soluz. di sali cc. 7, più *petrolio* cc. 1.
Atmosfera priva di CO_2
Durata dell'esp. *giorni 15* a 24° C.

Sviluppo microbico evidentissimo.
CO_2 formatasi = mgr. 75,5.

Esp. n. 5. — Piastra al silico-gele di cm. 14 di diametro.

Soluz. di sali cc. 7; più *olio di paraffina* cc. 1.
Atmosfera priva di CO_2
Durata dell'esp. *giorni 7* a 24° C.

Sviluppo microbico poco evidente.
CO_2 formatasi = mgr. 8,7.

Esp. n. 6. — Piastra al silico-gele di cm. 14 di diametro.

Soluz. di sali cc. 7; più *olio di paraffina* cc. 1.
Atmosfera priva di CO_2
Durata dell'esp. *giorni 15* a 24° C.

Sviluppo microbico abbastanza evidente.
CO_2 formatasi = mgr. 45,1.

Esp. n. 7. — Piastra al silico-gele di cm. 14 di diametro.

Soluz. di sali cc. 7; più petrolio cc. 1.
Atmosfera di idrogeno.
Durata dell'esp. *giorni 7* a 24° C.

Sviluppo microbico meno evidente che in 3.
CO_2 formatasi = mgr. 17.

Esp. n. 8. — Piastra al silico-gele di cm. 14 di diametro.

Soluz. di sali cc. 7; più *petrolio* cc. 1.
Atmosfera di idrogeno.
Durata dell'esp. *giorni 15* a 24° C.

Sviluppo microbico più evidente che in 7.
CO_2 formatasi = mgr. 52.

Esp. n. 9. — Piastra al silico-gele di cm. 14 di diametro.

Soluz. di sali cc. 7; più *olio di paraffina* cc. 1.
Atmosfera di idrogeno.
Durata dell'esp. *giorni 7* a 24° C.

Sviluppo meno evidente che in 5.
CO_2 formatasi = mgr. 7,4.

Esp. n. 10. — Piastra al silico-gele di cm. 14 di diametro.

Soluz. di sali cc. 7; più *olio di paraffina* cc. 1.
Atmosfera di idrogeno.
Durata dell'esp. *giorni 15* a 24° C.

Sviluppo un po' più abbondante che in 9.
CO_2 formatasi = mgr. 35,3.

Riassumiamo i dati delle esperienze 3-10 nel seguente prospetto:

Idrocarburo:			Durata dell'esp. giorni	mgr. CO^2	Intensità di sviluppo
Petrolio	in aria priva di CO^2	(esp. 3)	7	41.7	+ + + +
		(» 4)	15	75.5	+ + + + +
	in atmosfera di H	(esp. 7)	7	17.–	+ + +
		(» 8)	15	52.–	+ + + +
Olio di paraffina	in aria priva di CO^2	(esp. 5)	7	8.7	+ +
		(» 6)	15	45.1	+ + + +
	in atmosfera di H	(esp. 9)	7	7.4	+ +
		(» 10)	15	35.3	+ + +

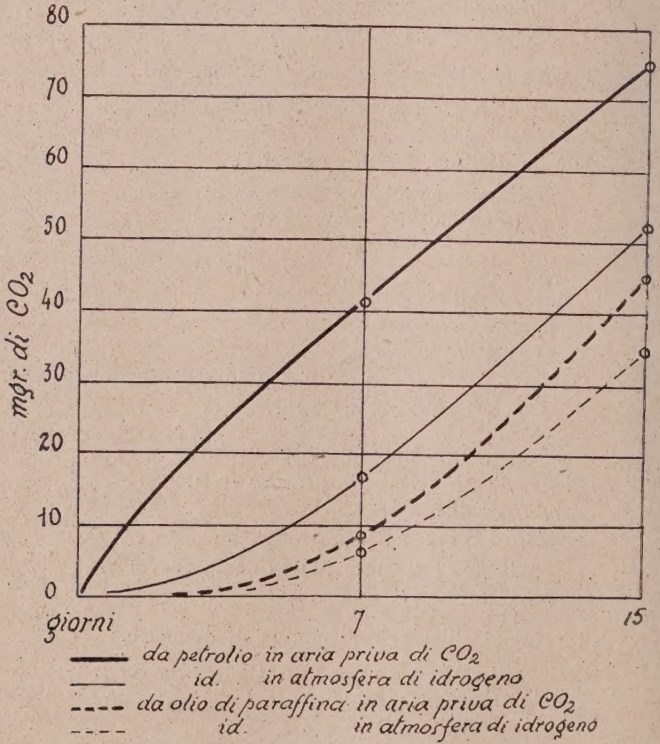


Fig. 3. — Traduzione grafica dei risultati di cui alle esperienze 3-10.

Questo primo gruppo di esperienze ci dimostra che, in condizioni di ossibiosi come, sebbene con minore intensità, di anaerobiosi, è possibile lo sviluppo di forme microrganiche capaci di accrescersi a spese del carbonio contenuto nei composti costituenti il petrolio e l'olio di paraffina, utilizzando quale sorgente azotata l'azoto nitrico con formazione di anidride carbonica.

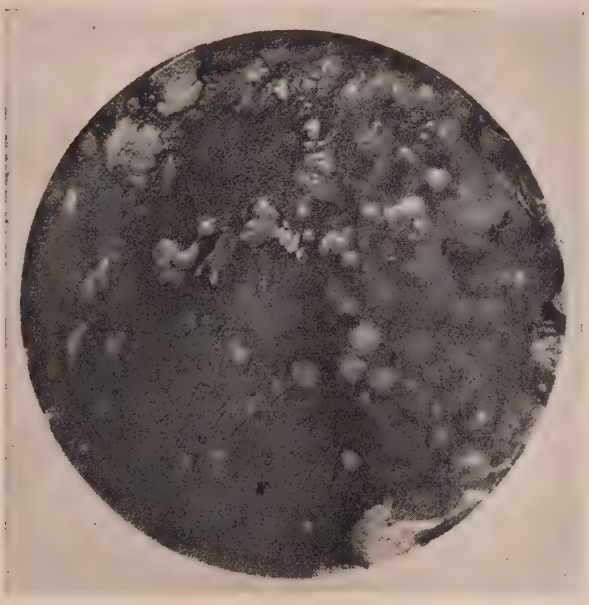


Fig. 4. — Sviluppo microbico in piastra al silico-gele contenente petrolio, coltivata per 15 giorni a 24° C. in aria priva di CO_2. (Circa la metà del naturale).

Fig. 5. — Sviluppo microbico in piastra al silico-gele contenente olio di paraffina, coltivata per 15 giorni a 24° C. in aria priva di CO_2. (Circa la metà del naturale).

Tuttavia, a maggior conferma del fatto e allo scopo di stabilire l'influenza di diverse sorgenti azotate furono istituite altre prove che riferiamo in questa

2.ª Serie di esperienze.

Esp. n. 11. — Erlenmeyer da cc. 1000 contenente cc. 250 del liquido 1 addizionato di cc. 0,5 di *petrolio*.
Recipiente e liquido non sterilizzati.
Durata dell'esp. *giorni 7* a 24° C. in atmosfera priva di CO_2.
Sviluppo evidente: intorbidamento e molto sottile pellicola.
CO_2 formatasi = mgr. 28,4.

Esp. n 12. — Come l'esp. precedente ma prolungata per *giorni 15*.
Sviluppo più abbondante che in 11.
CO_2 formatasi = mgr. 72,6.

Esp. n. 13. — Erlenmeyer da cc. 1000 contenenti cc. 250 del liquido 1 a cui fu sostituito, in quantità equimolecolari, *solfato ammonico* al posto del nitrato potassico, e addizionato cc. 0,5 di *petrolio*.
Recipiente e liquido non sterilizzati.
Durata dell'esp. *giorni 7* a 24° C. in atmosfera priva di CO_2.
Sviluppo evidente superiore a quanto in 11.
CO_2 formatasi = mgr. 34.

Esp. n. 14. — Come l'esp. precedente (13) ma prolungata per *giorni 15*.
Sviluppo più abbondante che in 13.
CO_2 formatasi = mgr. 109,4.

Esp. n. 15. — Erlenmeyer da cc. 1000 contenenti cc. 250 del liquido 1 addizionato di cc. 0,5 di *olio di paraffina*.
Recipienti e liquido non sterilizzati.
Durata dell'esp. *giorni 7* a 24° C. in atmosfera priva di CO_2.
Sviluppo un po' più che mediocre.
CO_2 formatasi = mgr. 21,6.

Esp. n. 16. — Come l'esp. precedente (15) ma prolungata per *giorni 15*.
Sviluppo discreto.
CO_2 formatasi = mgr. 52,2.

Esp. n. 17. — Erlenmeyer da cc. 1000 contenenti cc. 250 del liquido 1 con *solfato ammonico* (in quantità equimolecolari) al posto del nitrato potassico e addizionato di cc. 0,5 di *olio di paraffina*.
Recipiente e liquidi non sterilizzati.
Durata dell'esp. *giorni 7* a 24° C. in atmosfera priva di CO_2.
Sviluppo mediocre.
CO_2 formatasi = mgr. 25,4.

Esp. n. 18. — Come l'esp. precedente (17) ma prolungata per *giorni 15*.
Sviluppo discreto.
CO_2 formatasi = mgr. 63,8.

Riassumendo:

Idrocarburo:	Sorg. azotata		Durata dell'esp. giorni	mgr. CO^2	Intensità di sviluppo
Petrolio	nitrato potassico	(esp. 11)	7	28.4	+ + +
		(» 12)	15	72.6	+ + + +
	solfato ammonico	(esp. 13)	7	34.-	+ + + +
		(» 14)	15	109.4	+ + + + +
Olio di paraffina	nitrato potassico	(esp. 15)	7	21.6	+ +
		(» 16)	15	52.2	+ + +
	solfato ammonico	(esp. 17)	7	25.4	+ + +
		(» 18)	15	63.8	+ + + +

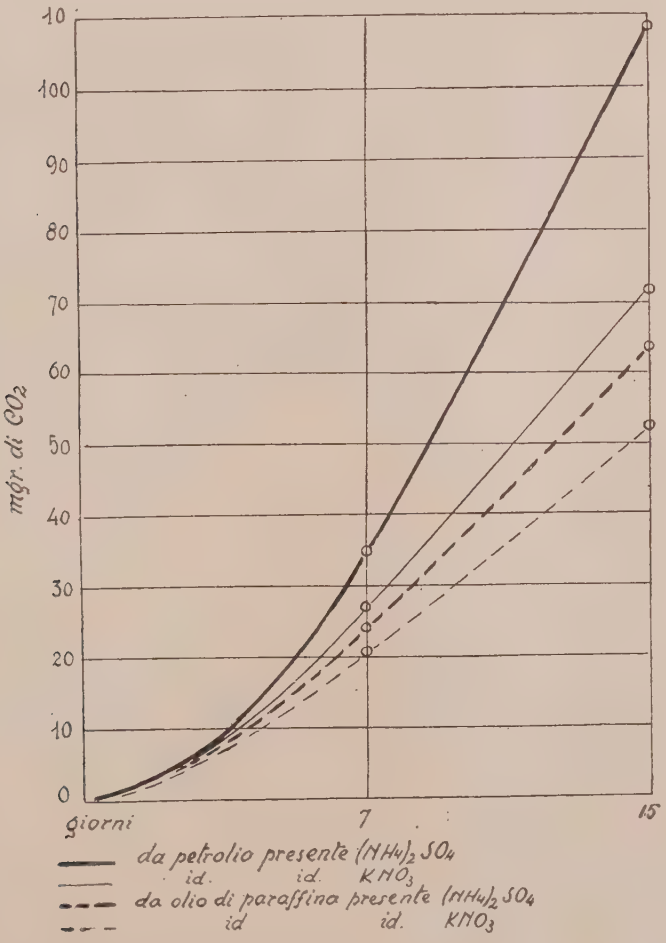


Fig. 6. — Traduzione grafica dei risultati di cui alle esperienze n. 11-18.

Le esperienze di questo secondo gruppo ci danno conferma dei risultati conseguiti attraverso le prime prove. Cioè, decomposizione più intensa dei costituenti del petrolio che non dell'olio di paraffina; ed inoltre dimostrano che tale demolizione può avvenire a spese — nei riguardi della

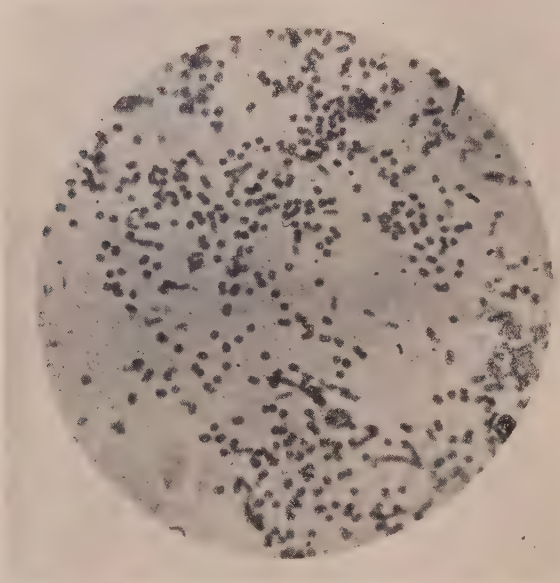


Fig. 7. — Fotomicrografia delle forme presenti nel liquido di cui all'esp. 1. (Ingr. circa 1500).

sorgente azotata — non solo dell'azoto nitrico ma anche dell'azoto ammoniacale. Sembrerebbe anzi che il solfato ammonico agisca a preferenza del nitrato potassico e ciò del resto in accordo con quanto è noto sulla utilizzazione microrganica di sali azotati minerali.

Un esame microscopico diretto dei liquidi colturali fu eseguito al termine di ciascuna esperienza. Nel liquido di cui all'esp. 1 (petrolio) fu dato di notare grandissima prevalenza di vegetazioni cocciformi accanto a scarse forme allungate come è dimostrato dal fotogramma di fig. 7. Nel liquido di cui all'esp. 2, invece (olio di paraffina), molto scarse furono le forme rotonde e frequenti invece forme allungate, talvolta ricurve, con granulazioni metacromatiche richiamanti quei « punti metacromatici » che si presentano specialmente espressivi nel bacillo difterico (fig. 8).

Nel liquido di cui all'esp. 12 (petrolio-nitrato) scarsissime forme ro-

tonde e prevalenza di bastoncini tozzi o mediocremente lunghi, talvolta non ben colorabili.

Nel liquido dell'esp. 14 (petrolio-solfato ammonico) il reperto è analogo a quello fissato in fig. 7: prevalenza di forme rotonde contro scarse forme a corto bastoncino.

Fig. 8. (Spiegazione nel testo).

Nel liquido dell'esp. 16 (o. di paraffina-nitrato) mancano o sono rare le forme rotonde mentre prevalgono forme a bastoncino in gran parte sporificate.

Nel liquido dell'esp. 18 (o. di paraffina-solfato ammonico) forme rotonde ben colorabili non frequenti accanto a forme a tozzo bastoncino o anche rotonde ma non bene colorabili.

Demolizione del Petrolio e dell'Olio di paraffina da parte di colture pure.

I reperti di cui sopra sono stati ottenuti, come si è premesso, a mezzo di colture spontanee, lasciando cioè sviluppare nei substrati le forme in essi esistenti o d'ambiente. Onde cimentare di fronte al petrolio e all'olio di paraffina l'azione di colture pure si è proceduto come nelle ultime esperienze, cioè allestendo matracci da 1000 cc. contenenti 250 cc. di liquido minerale (liq. 1) presente solfato ammonico anzichè nitrato potassico e a parte sterilizzate, più cc. 0,5 di petrolio o di olio di paraffina la cui sterilità si raggiunse mediante filtrazione (1).

In quanto alle specie ne provammo alcune di collezione e altre all'uopo isolate mediante piastre al silico-gele dalle colture spontanee. Le determinazioni della CO_2 vennero eseguite dopo 15 o 30 giorni di permanenza a 24° C.

	mgr. di CO^2 sviluppatasi dopo 15-30 g. a 24° C.	
	Petrolio (15 gr.)	Olio di paraffina (30 gr.)
Esp. n.° 19-20. Forma 1 (da coltura di isolamento)	22. 4	18. 4
» » 21-22. » 2 (» »)	16. 6	14. 8
» » 23-24. » 3 (» »)	40. 2	47. 6
» » 25-26. » 4 (» »)	32. 2	26. 8
» » 27-28. *Bac. subtilis.*	17. -	8. -
» » 29-30. *Cladosporium* sp. (da colt. d'isolamento)	6. 4	5. 6
» » 31-32. *Asp. niger*	—	—
» » 33-34. *Sacch. cerevisiae*	—	—

(1) Aggiunto l'idrocarburo non si procedette subito alla semina ma fu atteso qualche giorno onde assicurarsi della sterilità del sistema. Avvenuta la semina con il trasporto di una piccola quantità di patina del germe, fu estratta la CO_2 mediante immissione di aria decarbonicata e sterile. La sterilizzazione dell'aria fu eseguita mediante passaggio in acido solforico e filtrazione per ovatta.

A parte, dunque, la più lenta e scarsa utilizzazione dell'olio di paraffina (e ciò in accordo con le precedenti ricerche), sia questo che il petrolio si sono dimostrati suscettibili di attacco da parte delle colture sperimentate ad eccezione di *Aspergillus niger* e *Sacc. cerevisiae*.

Ricerche complementari sulla utilizzazione del pentano e dell'ottano.

Dimostrandosi la utilizzazione microrganica del petrolio e dell'olio di paraffina non rimase accertata la utilizzazione del carbonio degli idrocarburi, in senso assoluto, sapendosi o supponendosi presenti, in composti sperimentati (petrolio, olio di paraffina), sostanze organiche di diversa natura. All'uopo quindi si sono istituite queste altre esperienze relativamente al pentano e all'ottano, e che abbiamo condotto analogamente alle precedenti.

Esp. n. 35. — Erlenmeyer da cc. 1000 contenenti cc. 250 del liquido di cui all'esp. n. 13, addizionato di cc. 0,5 di *pentano*.
Recipiente e liquido non sterilizzati
Durata dell'esperienza *giorni* 7 a 24° C.
Atmosfera priva di CO_2.
Sviluppo microbico: scarso.
CO_2 formatasi = mgr. 50,6.

Esp. n. 36. — Come l'esp. precedente: durata *giorni 15*.
Sviluppo microbico: notevole.
CO_2 formatasi = mgr. 82,6.

Esp. n. 37. — Erlenmeyer da cc. 1000 contenenti cc. 250 del liquido di cui all'esp. n. 13, addizionato di cc. 0,5 di *ottano*.
Recipiente e liquido non sterilizzati.
Durata dell'esperienza *giorni* 7 a 24° C.
Atmosfera priva di CO_2.
Sviluppo microbico: scarso.
CO_2 formatasi = mgr. 25.

Esp. n. 38. — Come l'esp. precedente: durata *giorni 15*.
Sviluppo microbico: discreto:
CO_2 formatasi = mgr. 63,8.

Esp. n. 39. — Piastra al silico-gele di cm. 14 di diametro.
Soluz. di sali (liq. 2) cc. 7, più *pentano* cc. 1.
Atmosfera priva di CO_2.
Durata dell'esperienza *giorni* 7 a 24° C.
Sviluppo microbico: scarso.
CO_2 formatasi = mgr. 41,8.

Esp. n. 40. — Come la precedente: durata *giorni 15*.
Sviluppo microbico: mediocre.
CO_2 formatasi = mgr. 56.

Esp. n. 41. — Piastra al silico-gele di cm. 14 di diametro.
Soluz. di sali cc. 7, più *ottano* cc. 1.
Atmosfera priva di CO_2.
Durata dell'esperienza *giorni* 7 a 24° C.
Sviluppo microbico: scarso.
CO_2 formatasi = mgr. 19.

Esp. n. 42. — Come la precedente (n. 41): durata *giorni 15*
Sviluppo microbico: mediocre.
CO_2 formatasi = mgr. 43,4.

Esp. n. 43. — Piastra al silico-gele di cm. 14 di diametro
Soluz. di sali cc. 7, più *pentano* cc. 1.
In atmosfera di idrogeno.
Durata dell'esperienza *giorni* 7 a 24° C.
Sviluppo microbico: scarso.
CO_2 formatasi = mgr. 53,2.

Esp. n. 44. — Come la precedente (n. 43): durata *giorni 15*
Sviluppo microbico: mediocre.
CO_2 formatasi = mgr. 94,4.

Esp. n. 45. — Piastra al silico-gele di cm. 14 di diametro.
Soluz. di sali cc. 7, più *ottano* cc. 1.
In atmosfera di idrogeno.
Durata dell'esperienza *giorni* 7 a 24° C.
Sviluppo microbico: scarso.
CO_2 formatasi = mgr. 17,8.

Esp. 46. — Come la precedente (n. 45): durata *giorni 15.*
Sviluppo microbico: mediocre.
CO_2 formatasi = 39,8.

Riassumiamo i dati delle esp. 39-46 nel seguente prospetto:

Idrocarburo:			Durata dell'esp. giorni	mgr. CO^2	intensità di sviluppo
pentano	in aria priva di CO^2	(esp. 39)	7	41.8	− − +
		(» 40)	15	56.−	+ − − − −
	in atmosfera di H	(esp. 43)	7	53.2	+ + +
		(» 44)	15	94.4	+ + + +
ottano	in aria priva di CO^2	(esp. 41)	7	19.−	+ +
		(» 42)	15	43.4	+ + +
	in atmosfera di H	(esp. 45)	7	17.8	+ +
		(» 46)	15	39.8	+ − +

Esami diretti dei liquidi colturali bruti contenenti pentano (esperimento n. 35-36) misero in evidenza forme in gran parte coccoidi isolate o in catene.

Reperti non molto dissimili si ebbero dall'esame di colture brute contenenti ottano (esp. n. 37-38).

Analogamente a quanto fu eseguito per il petrolio e per l'olio di paraffina cimentammo in mezzi sterili e separatamente le forme 1, 2, 3, 4

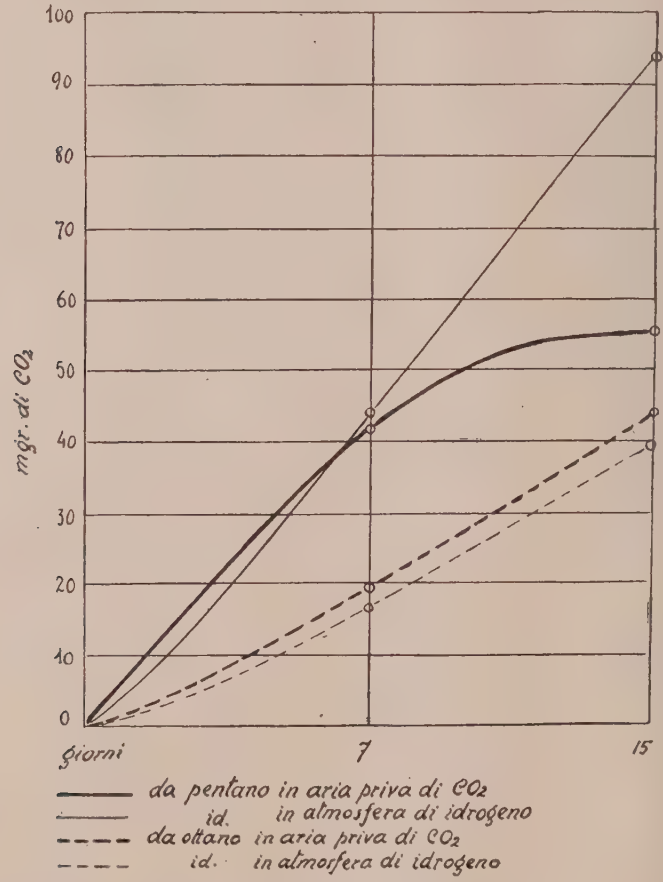


Fig. 9. — Traduzione grafica dei risultati di cui alle esp. 39-46.

procedendo come nelle esperienze 19-34. I risultati ottenuti furono i seguenti:

	mgr. di CO^2 sviluppatasi dopo 15 g. a 28° C.	
	pentano	ottano
Esp. n.i 47-48 Forma 1	25,6	19,2
» » 49-50 » 2	37,4	15,8
» » 51-52 » 3	28,2	33,9
» » 53-54 » 4	43,6	29,1

Senza sopravalutare il reperto quantitativo nei riguardi della produzione di CO_2 da pentano e ottano e neppure la maggiore o minore utilizzazione di questi da parte delle singole forme, un fatto ci sembra sopra ogni altro doversi rilevare e, cioè, la capacità, da parte dei microbi sperimentati, di utilizzare in modo non dubbio i detti composti. Il che dà indiretta conferma della utilizzazione del petrolio mentre ci indica che di questo possono venire ugualmente bene demoliti parte almeno degli idrocarburi componenti.

Descrizione delle forme isolate.

Chi, in tale argomento, ci ha preceduto, ha sempre trascurato di descrivere, con dettaglio, le forme rinvenute o segnalate. Così è che, la gran parte di quelle specie, può dirsi perduta o di difficile e dubbia precisazione. Le specie da noi isolate e studiate sistematicamente sono in numero di cinque di cui quattro (Forme n. 1, 2, 3, 4) riferibili a Schizomiceti, e l'altra ad un Ifale demaziaceo.

Forma N. 1. — Si presenta costituita da tozzi bacilli isolati, abbinati o disposti in catena di μ 1,4-1,6 × 3,3-4,2. Nei comuni preparati appaiono immobili a causa forse dell'abbondante muco che li avvolge. Con le opportune colorazioni è però possibile, non senza qualche difficoltà, di mettere in evidenza esili ciglia peritriche. Presentano estremità appiattite nelle cellule giovani ma in seguito rotonde. Il plasma è dapprima finemente granuloso per presenza di corpuscoli metacromatici, indi vacuolizzato. Il processo di vacuolizzazione precede quello di sporificazione che si compie facilmente. Le cellule sporificate non assumono forma diversa dalle cellule vegetative. La spora si mantiene centrale o, se anche si sposta verso un polo in corrispondenza di questo non si determina alcun evidente ingrossamento come nelle tipiche forme clostridriche.

Le spore presentano membrana evidente, sono cilindriche o reniformi, di μ 1,2-1,4 × 2,2-2,4 : talvolta rimane nelle immediate vicinanze di qualcuna di esse una parte della membrana della cellula madre. La germinazione si compie facilmente. Perdono in parte la loro rifrangenza mentre nell'interno è visibile talvolta il differenziarsi della cellula vegetativa la quale fuoriesce, di norma, polarmente o, in rari casi, per rottura equatoriale della membrana. La giovane cellula, appena uscita dalla spora, può mantenere il residuo della membrana di questa. Uscita, si moltiplica per scissione originando una serie generalmente non lunga di cellule.

Nelle vecchie colture in agar, accanto alle cellule sporificate, si osservano numerose forme involutive. Queste, da prima, si presentano tozze o poco allungate, ora con evidenti e regolari vacuoli, ora con protoplasma omogeneo; in seguito si allungano incurvandosi anche, mentre gli apici emettono un sottile e più o meno lungo prolungamento piuttosto rifrangente la luce.

Le giovani cellule si colorano bene con i comuni colori di anilina, resistono alla decolorazione secondo Gram, non sono acido-resistenti. Trattate con iodio si colorano in rosso-bruno per presenza di glicogeno: tale colorazione si rende meno evidente nelle cellule in via di sporulazione per scomparire, quasi, nelle cellule sporificate.

Le strie in agar-fagiuoli hanno rapido sviluppo. Si presentano dapprima come una patina continua, estesa, bianchiccia, opaca, umida, fortemente mucosa e scolante; in seguito la mucosità si deposita al fondo e la stria appare semi-trasparente, specie al centro, rimanendo gli orli più densi.

Su agar-carne l'aspetto è analogo.

Su patata, lo sviluppo è anche rapido. Si ha densa patina non mucosa, leggermente rilevata, con superficie granulosa, secca, di colore gialliccio: invecchiando si formano lievi increspature e qualche solco. Il substrato non imbrunisce.

Su carota, i caratteri della vegetazione riprendono quelli delle strie su agar: abbondante formazione di muco che si deposita al fondo in una massa densa, bianco-gialliccia.

La gelatina viene fluidificata rapidamente a cilindro.

Il latte coagula al secondo giorno a 24° C.: il coagulo, piuttosto abbondante e compatto, lascia poco siero che si fa più copioso al 15-20° giorno. Il coagulo non si ridiscioglie.

Non si forma indolo.

Non si ha riduzione di nitrati.

In brodo intorbidamento leggero del liquido: non si forma nè pellicola nè anello ma soltanto sedimento fioccoso.

Dimostrò assimilare abbondantemente xilosio, galattosio, levulosio, saccarosio, maltosio, raffinosio, mannosio, glucosio; un po' meno lattosio, mannite; discretamente glicerina, meno asparagina e nitrato potassico, poco solfato ammonico, non nitrito potassico.

I substrati contenenti idrati di carbonio vengono leggermente acidificati ma da nessuno degli zuccheri in prova si ebbe formazione di gas.

Per quanto ha riferimento alla posizione sistematica è chiaro che la

forma rientra, senza dubbio, nel gruppo dei *bacilli sottili* i caratteri dati collimando quasi con quelli noti per *Bac. subtilis* (Ehremberg) Cohn.(1).

Forma N. 2. — In colture di 12 ore, si presenta costituita da tozzi bacilli ad estremità tagliate riuniti in lunghi fili. Appare immobile ma le opportune colorazioni mettono in evidenza esili ciglia peritriche. I fili in seguito si disarticolano e le cellule, alle estremità, si arrotondano. Il plasma è finemente granuloso. Misurano μ 1,65 × 4,95 circa. Sporifica. La sporificazione si compie facilmente con il determinarsi di una spora centrale di forma cilindrica di μ 1,4 × 2,2-2,4. Le cellule sporificate mantengono la forma delle cellule vegetative presentando, cioè, estremità arrotondate oppure anche, non infrequentemente, affusolate. La germinazione delle spore è generalmente polare.

In vecchie colture, anche di 3-4 mesi, non si osservano particolari forme involutive.

Le giovani cellule si colorano bene con i comuni colori di anilina, resistono alla decolorazione secondo Gram, non sono acido-resistenti. Trattate con iodio si colorano in rosso-bruno per la presenza di glicogeno.

Le strie in agar-fagiuoli sono di rapida crescita. Assumono l'aspetto di patina continua, estesa, biancastra, prima quasi membranosa indi poltacea densa e opaca salvo agli orli, più sottili, filamentosi e semi trasparenti, umida, poco scolante.

Aspetto analogo su agar-carne.

Su patata si forma una patina bianchiccia, leggermente rilevata e leggermente granulosa e di aspetto umido, ma non molto.

Su carota non si ha sviluppo manifesto. Al più, si rende visibile una scarsa vegetazione in corrispondenza della regione strisciata.

In gelatina lo sviluppo è rapido e rapida la fluidificazione, a cilindro.

Non si forma indolo.

I nitrati non vengono ridotti.

Il latte coagula al 2°-3° giorno (24° C.) in una massa fine, sierosa. Dopo 15-20 giorni il coagulo si ridiscioglie : la reazione rimane invariata.

In brodo forma anello e sottile pellicola labile all'agitazione ; il liquido intorbida e al fondo formasi deposito fioccoso.

---

(1) È appena il caso di ricordare che un confronto esatto con *Bac. aliphaticus liquefaciens* (Tausz et Peter) — una delle poche specie, in argomento, sufficientemente descritte — si è reso impossibile non essendo stato conservato. Del resto ci sembra, dalla descrizione data e dalle figure che l'accompagnano, che anche questa specie rientri nel gruppo dei *sottili*.

Assimila molto bene galattosio, xilosio, levulosio, saccarosio, maltosio, raffinosio, mannosio, glucosio, lattosio, mannite; meno bene asparagina, glicerina, nitrato potassico; poco solfato ammonico, non nitrito potassico.

Acidifica più o meno i substrati contenenti idrati di carbonio ma non forma gas da nessuno zucchero.

Per quanto ha riferimento alla posizione sistematica la forma rientra, tipicamente, in *Bac. subtilis* (Ehremberg) Cohn. Dalla forma n. 1, anch'essa riportabile al gruppo dei b. sottili, si discosta per non rilevanti caratteri colturali (1).

Forma N. 3. — Piccoli bastoncini mobilissimi di μ 0,6-0,8 × 1,2-1,6 isolati o abbinati o in rare labili catene.

Si colorano bene con i comuni colori di anilina, non resistono alla decolorazione secondo Gram.

Non formano spore.

Le strie su agar dànno luogo ad una patina continua, estesa, poltacea, color arancio, opaca, umida, scolante. Orlo continuo.

Analogo aspetto su agar-carne.

Nei brodi, anello in superficie, deposito al fondo: liquido poco torbo.

Su patata, vegetazione abbondante, umida, poltacea, color arancio.

Nel latte, sviluppo abbondante in superficie ove forma coperta color arancio e leggero deposito al fondo. Non coagulazione, non peptonizzazione: reazione immutata.

Nella gelatina, in colture per infissione, sviluppo abbondante in superficie e forte infossamento al 45° giorno. Lungo il fittone sviluppo scarso. Non fluidificazione.

Con tali caratteri, pur non molto completi, si può tentare il riferimento sistematico della forma non senza avvertire come si notino non poche difficoltà nella esatta determinazione dei batteri cromogeni all'infuori di quelli tipici per le numerose specie descritte e le sommarie descrizioni date.

Comunque la nostra forma si discosta da *Bact. ochraceum* (Zimm.) L. et N. in quanto Gram-positivo e liquefaciente. Da *Bact. fulvum*

---

(1) Torna qui opportuno di dire che, avendo potuto avvicinare o identificare, le forme 1 e 2 descritte, con *Bac. subtilis,* abbiamo voluto vedere se, tale specie, si comportasse in modo non diverso di fronte agli idrocarburi in esperimento.

Le esperienze nel testo riferite (esp. 27-28) e condotte con un ceppo tipico isolato dal suolo, hanno dimostrato, per *Bac. subtilis,* un comportamento analogo a quello delle forme 1 e 2.

(Zimm.) L. et N. per essere questo immobile e Gram-positivo. Da *Bact. aureum* (Frankland) immobile e fluidificante. Da *Bact. aurantinum* (Hammer) coagulante e isolato da latte. Da *Bact. aurescens* (Frankland) immobile. Da *Bact. aurescens* (Ravenal) in quanto fluidificante. Più si avvicina, invece, e diremmo potrebbe rientrare in *Bact. aurantiacum* (Frankland) e in *Bact. chrysogloea* Zopf. Di queste due specie non si conoscono esattamente i caratteri secondari mentre collimano i caratteri principali neppur sempre ben chiaramente fissati dai singoli Autori. Stando anzi così le cose noi non riterremmo inopportuno fondere le due specie lasciando, per priorità, la denominazione di Zopf. Lo studio della forma qui descritta sarà, ad ogni modo, ripreso con estensione (1).

Forma N. 4. — Piccoli bastoncini, mobilissimi, di μ 0,8 × 1,2-1,6 ad estremità arrotondate, isolati o, più spesso, abbinati.

Si colorano bene con i comuni colori di anilina ma sono Gram-negativi. Non acido-resistenti.

Non formano spore.

Le strie su agar dànno luogo a patina continua, estesa, poltacea, giallo-uovo, opaca, umida, non scolante.

Lo stesso aspetto assume, la patina, in agar-carne.

Nei brodi anello in superficie, deposito al fondo. Il liquido intorbida.

Su patata, discreta vegetazione gialla.

Nel latte, dopo 60 giorni, sviluppo abbondante con spesso anello giallo e denso deposito. Non coagulazione nè peptonizzazione. Reazione leggermente acida.

In gelatina sviluppa stentatamente. Non si ha fluidificazione al 45° giorno.

Specie batteriche a pigmento giallo sono state descritte numerose. I confronti eseguiti, per quanto ha riferimento alla posizione sistematica, ci hanno indicato trattarsi di una specie assai vicina a *Bact. turcosum* (Zimm.) L. et N.

Forma N. 5 : *Cladosporium* sp. — Vegetazione miceliare densa, compatta, abbondante, olivacea da prima, indi nero-verdastra in seguito. Conidiofori eretti, ramosi, settati, di dimensioni varie, olivacei o bruni.

---

(1) Mentre L. e N. non dànno cenno di *Bact. aurantiacum* ricordano di avere isolato dal contenuto dello stomaco un *Bact.* sp. assai vicino a *Bact. chrysogloea,* giusta la descrizione data da Zimmermann, Gram-positivo, mobile. Essi lo considerano come la forma mobile di *Bact. fulvum* di Zimmermann.

Bact. chrysogloea Zimm. è da ritenersi però diverso dalla primitiva specie di Zopf data come Gram-negativa.

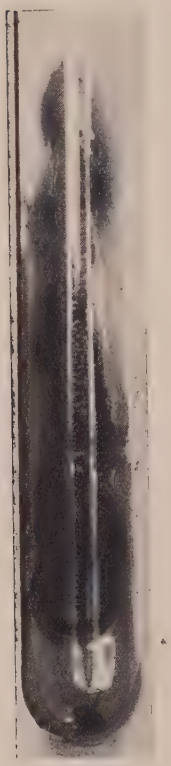


Fig. 10.
Cladosporium sp.
Coltura su agar inclinato di 30 g. di età a 24° C.

Conidi isolati o in catenelle, tondeggianti, ovali o anche allungati di solito non settati di dimensioni assai varie. Giusta le esp. 29-30 tale specie si dimostra utilizzare, sia pur scarsamente, petrolio e olio di paraffina.

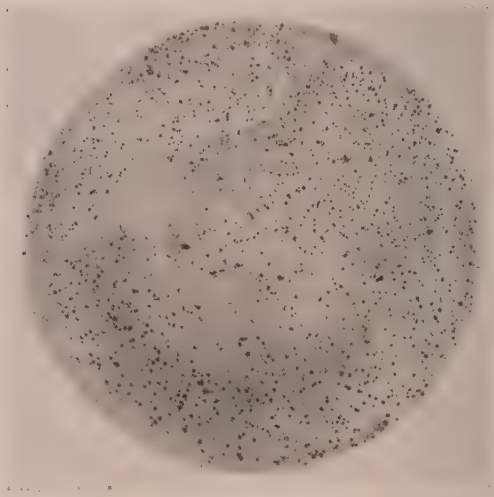


Fig. 11. — Piastra al silico-gele (contenente come sorgente di carbonio petrolio) con piccole colonie di *Cladosporium* sp. (ridotta ad $^1/_3$).

CONCLUSIONI.

Ripreso lo studio relativo alla utilizzazione microrganica di alcuni idrocarburi alifatici è stato messo in rilievo:

1.°) che, in condizioni di ossibiosi come, sebbene con minore intensità, di anaerobiosi, è possibile lo sviluppo di forme microbiche capaci di accrescimento a spese del carbonio contenuto nei composti costituenti il petrolio e l'olio di paraffina, utilizzando quale sorgente azotata l'azoto nitrico o l'azoto ammoniacale con formazione di anidride carbonica;

2.°) che, come petrolio e olio di paraffina, ugualmente bene vengono utilizzati pentano e ottano;

3.°) che la utilizzazione delle prime, come delle seconde sostanze, è dimostrabile a mezzo di colture brute ed anche di colture pure, in specie da quelle isolate;

4.°) che le specie isolate e sperimentate furono riferite: una ad uno sporigeno vicino a *Bac. subtilis*, un'altra a *Bac. subtilis* (Ehr.) Cohn., le altre a *Bact. chrysogloea* Zopf., a *Bact. turcosum* (Zimm.) L. et N. e a *Cladosporium* sp.;

5.°) che molte altre specie, a comportamento auto-eterotrofico, allungate o coccoidi, debbono prendere parte al fenomeno di demolizione degli idrocarburi.

Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica della R. Università di Pisa, Ottobre 1935 - XIII.

Spiegazione delle Tavole I-II.

TAV. I. — FORMA 1.

I, striscio su agar-fagiuoli dopo 7 giorni a 24° C.;

II, 1-5 spore; 6-11 germinazione delle spore; 12 forme vegetative; 13 disegno delle ciglia; 14-15 cellule sporificate e spore; 16 forme involutive;

III, preparato da coltura in agar di due giorni, fissato e colorato con eritrosina fenica (ingr. 2700);

IV, preparato da coltura in agar di 15 giorni fissato e colorato con eritrosina fenica; sono evidenti rare forme normali miste a forme involutive e spore (ingr. 2700).

TAV. II. — FORMA 2.

I, striscio su agar-fagiuoli dopo 7 giorni a 24° C.;

II, 1-8 cellule sporificate e spore; 9-13 germinazione delle spore; 14 forme vegetative; 15 disegno delle ciglia; 16 cellule sporificate e spore;

III, preparato di coltura di 24 ore colorato a fresco con violetto di genziana (ingr. 2700);

IV, cellule sporificate (ingr. 2700).

Bibliografia.

1. O. VERONA, *Il « Cephalosporium subverticillatum Schulz. et Sacc. » quale idrocarburofilo.* (Nuovo Giornale Bot. Ital., n. s., **39**, *674*, 1932).

— *Forme microrganiche rinvenute immerse in idrocarburi alifatici.* (Ibidem, **40**, 1933).

2. N. L. SÖHNGEN, *Ueber Bakterien, welche Methan als Kohlenstoffnährung und Energiequelle gebrauchen.* (Centr. f. Bakt. II Abt., **15**, *513*, 1906).

3. K. KASERER, *Ueber die Oxydation des Wasserstoffes und des Methan durch Mikroorganismen.* (Ibidem, **15**, *573*, 1906).

4. W. H. HARRISON e P. A. S. AIYER, *The gases of swamp rice soil. II Their utilization for the aeration of the roots of the crop.* (Mem. Dept. Agr. India, **4**, *1*, 1916).

P. A. S. AIYER, *The gases of swamp rice soil. A methane-oxidizing Bacterium from rice soil.* Ibidem, **5**, *173*, 1916.

5. O. RAHN, *Ein Paraffin Zersetzender Schimmelpilz.* (Centr. f. Bakt., II Abt., **14**, *382*, 1906).

6. GOLA, *Osservazioni sopra un fungo vivente sopra idrocarburi alifatici.* (Bull. Soc. Bot. Ital., *224*, 1912).

7. N. L. SÖHNGEN, *Benzine, Petroleum Paraffinöl und Paraffin als Kohlenstoff und Energiequelle für Mikroben.* (Centr. f. Bakt., II Abt., **37**, *595*, 1913).

8. H. BÜTTNER, *Zur Kenntnis der Mykobakterien, insbesondere ihres quantitativen Stoffwechsels auf Paraffinnährböden.* (Arch. Hyg., **97**, *12*, 1916).

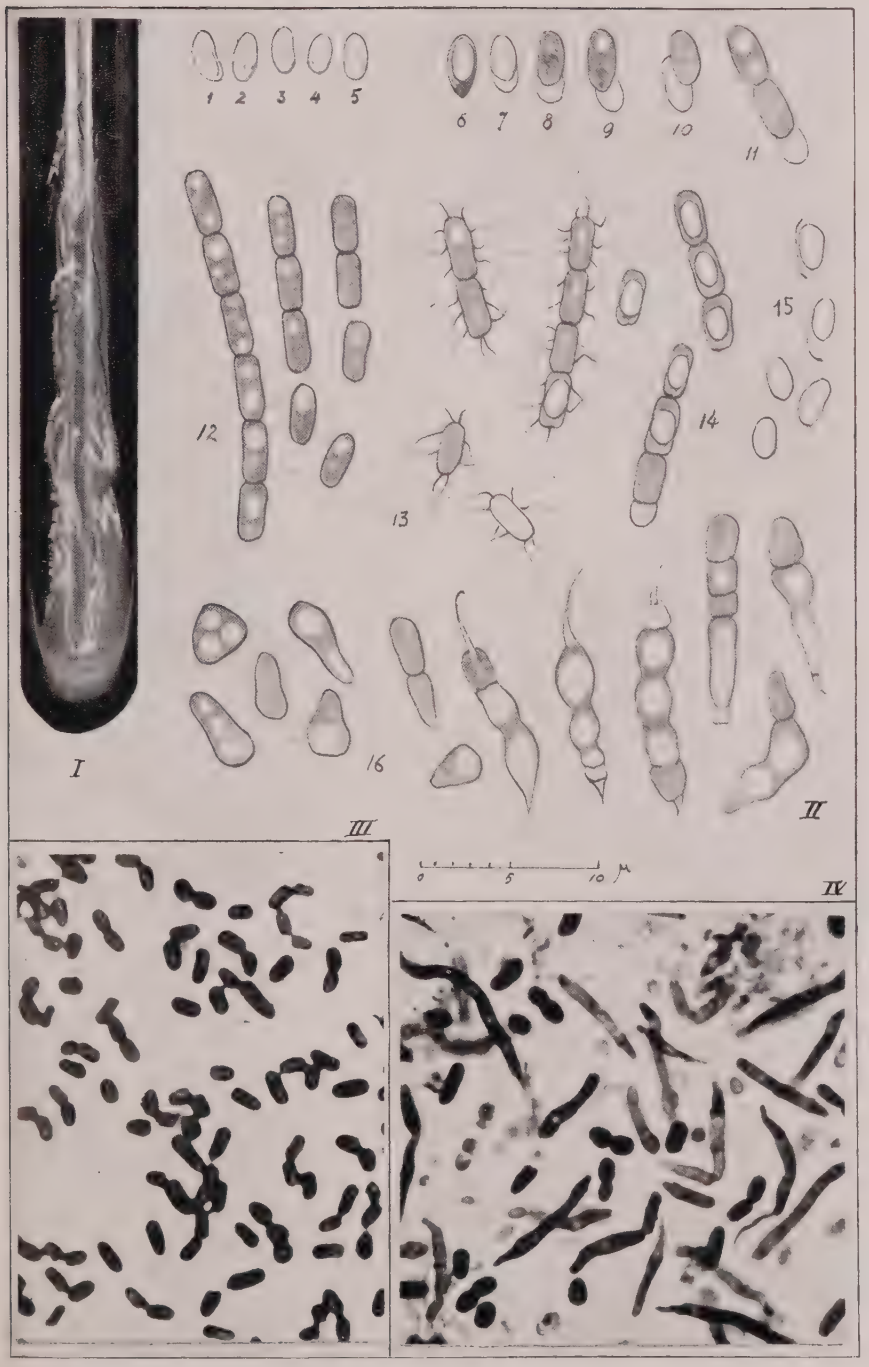
9. J. TAUSZ e M. PETER, *Neue Methode der Kohlenwasserstoffanalyse mit Hilfe von Bakterien.* (Centr. f. Bakt., II, **49**, *495*, 1919).

10. F. E. HAAG, *Ueber die Bedeutung von Doppelbindungen in Paraffin des Handels für das Wachstum von Bakterien.* (Ibidem, **97**, *28*, 1925).

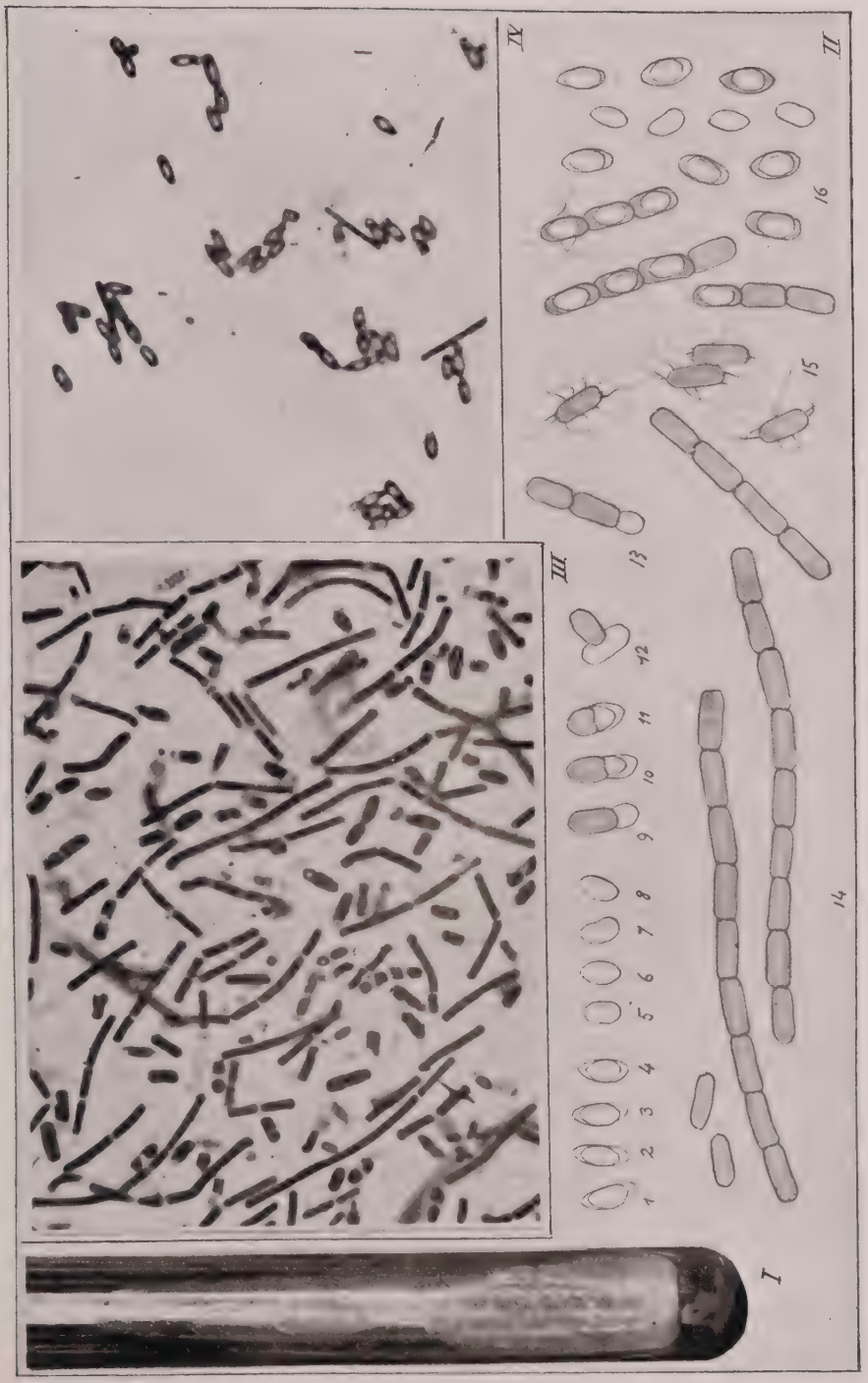
11. C. B. LIPMANN e L. GREENBERG, *A New autotrophic Bacterium which oxidises ammonia directly to nitrate and decomposes petroleum.* (Nature, **129**, *204*, 1932)

RIASSUNTO.

È studiata l'utilizzazione di alcuni idrocarburi alifatici, come petrolio, olio di paraffina, pentano e ottano, da parte di alcuni microrganismi (Schizomiceti e Ifali).



O. Verona e F. Rossi. — *Sulla utilizzazione microrganica di alcuni idrocarburi.*



O. Verona e F. Rossi. — *Sulla utilizzazione microrganica di alcuni idrocarburi.*